



(19) **SU⁽¹¹⁾ 1 646 258⁽¹³⁾ A3**
(51) **МПК⁶ C 07 C 311/38, G 01 N 33/50, C 07 D 295/26**

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО
ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ СССР

(21), (22) Заявка: 4667842/04, 08.02.1989

(46) Дата публикации: 10.02.1996

(56) Ссылки: Авторское свидетельство СССР N 1419108, кл. C 07C 143/80, G 01N 33/573, C 07D 295/22, 1985.

(71) Заявитель:
Институт биохимии АН ЛитССР,
Институт молекулярной генетики АН СССР

(72) Изобретатель: Палайма А.И.,
Бутенас С.Ю., Талайките З.А., Недоспасов А.А.

(73) Патентообладатель:
Институт биохимии Литовской АН

(54) 5-АМИНОНАФТАЛИН-1-СУЛЬФАМИДЫ В КАЧЕСТВЕ ДЕТЕКТИРУЕМЫХ ГРУПП СУБСТРАТОВ ДЛЯ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ПЕПТИДАЗ

(57) Изобретение касается сульфамидов, в частности 5-амино-нафталин-1-сульфида, замещенного O R_1 и R_2 , где R_1 -H, R_2 - C_1 - C_3 -алкил, изо- C_3 - C_4 - алкил, трет, бутил, амил, бензил, циклогексанил, C_2H_4O , $C_2H_4OCH_3$, C_2H_4 - O - C_2H_5 или $R_1=R_2=C_2H_5$ - алкил или $"NR_1R_2-NC(CH_3)_2"$, которые могут быть

использованы в качестве детектируемых групп субстратов для флуоресцентного анализа пептидов. Цель - создание более эффективных веществ указанного класса. Синтез ведут реакцией соответствующего амина с

5-фталимидонафталинсульфохлоридом в среде ацетона с последующей обработкой гидразингидратом при кипячении в среде

метанола Выход, %, т. пл., °С, brutto-фла-
 1) 84, 204 - 208, $C_{11}H_{17}N_2SO_2$ 2) 77, 130 -
 -133, $C_{12}H_{18}N_2SO_2$ 3) 93, 115 - 119
 $C_{13}H_{19}N_2SO_2$ 4) 91, 178 - 182, $C_{13}H_{19}N_2SO_2$
 5) 85, 138 -139, $C_{14}H_{18}N_2SO_2$ 6) 92, 213 -
 214, $C_{14}H_{18}N_2SO_2$ 7) 93, 233 - 234,
 $C_{16}H_{20}N_2SO_2$ 8) 80, 180 - 184, $C_{17}H_{16}N_2SO_2$
 9) 77, 140 -144, $C_{12}H_{14}N_2SO_2$ 10) 91, 111 -
 115, $C_{13}H_{16}N_2SO_3$ 11) 93, 79 - 82,
 $C_{14}H_{16}N_2SO_3$ 12) 95, 104 - 107,
 $C_{16}H_{18}N_2SO_3$ 13) 80, 143 - 144,
 $C_{16}H_{18}N_2SO_2$ 14) 70, 106 - 110,
 $C_{16}H_{18}N_2SO_2$

Новые вещества позволяют
 увеличить относительную интенсивность
 флуоресценции и расширить ассортимент
 детектируемых групп субстратов. 4 табл

SU 1646258 A3

SU 1646258 A3



(19) **SU** ⁽¹¹⁾ **1 646 258** ⁽¹³⁾ **A3**
(51) Int. Cl.⁶ **C 07 C 311/38, G 01 N 33/50,**
C 07 D 295/26

STATE COMMITTEE
FOR INVENTIONS AND DISCOVERIES

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 4667842/04, 08.02.1989

(46) Date of publication: 10.02.1996

(71) Applicant:
Institut biokhimii AN LitSSR,
Institut molekularnoj genetiki AN SSSR

(72) Inventor: Palajma A.I.,
Butenas S.Ju., Talajkile Z.A., Nedospasov A.A.

(73) Proprietor:
Institut biokhimii Litovskoj AN

(54) 5-AMINONAPHTHALENE-1-SULFAMIDES AS SUBSTRATE DETECTABLE GROUPS FOR PEPTIDASE ANALYSIS BY FLUORESCENCE

(57) Abstract

FIELD: organic chemistry. SUBSTANCE: synthesis is carried out by reaction of corresponding amine with 5-phthalimidonaphthalene sulfochloride in acetone medium followed by treatment with hydrazine hydrate at boiling in methanol medium. The yield, %, m. p. C; empirical formula: 1) 84; 204-208; C₁₁H₁₂N₂SO₂; 2) 77; 130-133; C₁₂H₁₄N₂SO₂; 3) 93; 115-118; C₁₃H₁₆N₂SO₂; 4) 91; 178-182; C₁₃H₁₆N₂SO₂.

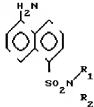
5) 85; 138-139; C₁₄H₁₈N₂SO₂; 6) 92; 213-214; C₁₄H₁₈N₂SO₂; 7) 93; 233-234; C₁₆H₂₀N₂SO₂; 8) 80; 180-184; C₁₇H₁₈N₂SO₂; 9) 77; 140-144; C₁₂H₁₄N₂SO₂; 10) 91; 111-115; C₁₃H₁₆N₂SO₂; 11) 93; 79-82; C₁₄H₁₈N₂SO₂; 12) 95; 104-107; C₁₄H₁₈N₂SO₂; 13) 80; 143-144; C₁₆H₂₂N₂SO₂; 14) 70; 106-110; C₁₆H₂₂N₂SO₂. EFFECT: increased relative fluorescence intensity, enlarged detectable groups of substrates 4 tbl

S U 1 6 4 6 2 5 8 A 3

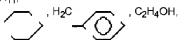
C A 8 5 2 9 6 9 1 U S

Изобретение относится к химии аминафталинсульфокислот, а именно к новым замещенным 5-аминафталин-1-сульфонидам общей формулы I

, где R₁ H, R₂ CH₃,



C₂H₅, C₃H₇ изо-C₃H₇, изо-C₄H₉, трет-C₄H₉, C₅H₁₁.



C₂H₄OCH₃, C₂H₄OCH₂CH₃ или R₁ R₂ C₂H₅, C₃H₇ или NR₁R₂ N(CH₂)₆.

в качестве детектируемых групп субстратов для флуоресцентного анализа пептидаз

Целью изобретения является изыскание в ряду аминафталинсульфокислот новых соединений, позволяющих при использовании их в качестве детектируемых групп увеличить относительную интенсивность флуоресценции и расширить ассортимент детектируемых групп субстратов.

П р и м е р 1
5-фталимидонафталин-1-пентилсульфамид, 13 мл (0,11 моль) пентиламина и 14 мл триэтиламина растворяют в 500 мл ацетона, добавляют в течение 10 мин 37,1 г (0,1 моль) 5-фталимидонафталин-1-сульфонилхлорида и перемешивают при 20°С 4 ч. Ацетон отгоняют при пониженном давлении, осадок заливают 1 л воды и через 20 ч отсасывают продукт. Промывают водой, сушат, перекристаллизуют из метанола и получают 41,4 г (выход 98%) хроматографически и аналитически чистого продукта с т.пл 155-157°С, R_f = 0,71 (алуфол, диэтиловый эфир-бензол, 1:1).

Найдено, С 65,54; Н 5,26; N 6,67; S 7,39.
C₂₂H₂₂N₂SO₄
Вычислено, С 65,39; Н 5,25; N 6,63; S 7,59.
Аналогично получают другие замещенные 5-фталимидонафталин-1-сульфамида.

П р и м е р 2
Аминафталин-1-пентилсульфамид, 4,23 г (0,01 моль) 5-фталимидонафталин-1-пентилсульфамида заливают 50 мл метанола, приквашивают 0,5 мл (0,01 моль) гидразингидрата и кипятят 4,5 ч. Метанол отгоняют, остаток экстрагируют 2х20 мл кипящего хлороформа, экстракт упаривают и остаток перекристаллизуют из метанола. Получают 2,19 г (выход 75%) хроматографически и аналитически чистого продукта с т.пл. 97-98°С, R_f 0,53 (алуфол, хлороформ-этилацетат, 1:1).

ПМР-спектр (δ DMSO) м.д. 0,86 (CH₃), 1,20 (CH₂), 2,75 (CH₂).

Найдено, С 61,46; Н 6,89; N 9,43; S 10,54.
C₁₅H₁₆N₂SO₂

Вычислено, С 61,62; Н 6,89; N 9,58; S 10,96

Аналогично получают другие замещенные 5-аминафталин-1-сульфамида. Их физико-химические характеристики

приведены в табл. 1. Соединения формулы I представляют собой желтые кристаллические вещества. Для доказательства преимуществ новых соединений определены их относительные интенсивности флуоресценции.

Установление относительной интенсивности флуоресценции. Спектры снимают на спектрофлуориметре "Hitachi MPF-4" (Япония) в относительном режиме при чувствительности 100. Относительную интенсивность флуоресценции рассчитывают по формуле

$$J_5 = \frac{J}{c \cdot 10^5} \cdot A, \text{ где } J \text{ — высота полосы}$$

эмиссии, мм,

с концентрация, моль/л;

A — соотношение максимальной чувствительности прибора и использованной чувствительности.

Для

5-аминафталин-1-пентилсульфамида

(соединение 5 в табл. 2) получают

$$J_5 = \frac{104 \cdot 100}{4,991 \cdot 100}$$

Измерение флуоресценции

5-аминафталин-1-циклогексилсульфамида 0,003675 г

5-аминафталин-1-циклогексилсульфамида растворяют в 10 мл 95%-ного этилового спирта, 0,4 мл этого раствора разбавляют 10 мл фосфатного буфера с pH 7,2 (0,067 M) и снимают спектр. Концентрация измеряемого раствора 4,978 · 10⁻⁵ моль/л, оптическая плотность при длине волны λ 350 нм 0,220; J 122 мм, I₅ 24,5.

Спектры остальных соединений представлены в табл. 2, измерены по этой же методике. Сравнение проводят с известными замещенными аминафталинсульфамидами 1 и 2 из табл. 2.

Применение смеси

5-аминафталин-1-сульфамидов в качестве детектируемых групп субстратов при определении ферментов.

Методика 1. Синтез

5-аргиниламинафталин-1-сульфамидов К раствору 7 г карбобензоксигаргина в 40 мл ДМФ приливают при -10°С полученный

при -30°С и выдержанный при 20°С в течение 40 мин раствор 2 мл SOCl₂ в 20 мл ДМФА, перемешивают 30 мин при 4°С, охлаждают до -20°С, добавляют раствор смеси

5-аминафталин-1-сульфамидов в 20 мл ДМФА (15 соединений по 1 ммоль каждого, соединения и их количества указаны в табл. 3),вливают 3 мл триэтиламина,

перемешивают 4 при 4°С и 12 ч при 20°С, добавляя триэтиламин до слабощелочной реакции, приливают 300 мл этилацетата и 400 мл гексана, осадок промывают смесью этилацетат-гексан, растворяют в смеси бутанол-вода, верхний слой отделяют, водный экстрагируют бутанолом. Бутанольные вытяжки промывают 5%-ным NaHCO₃, 10%-ным KHSO₄, упаривают досуха, заливают 80 мл 2,5M HBr в CH₃COOH, через 1,5 ч добавляют 1200 мл диэтилового эфира, осадок отфильтровывают, промывают эфиром и сушат.

Методика 2. Смесь солей аргиниламинафталинсульфамидов, полученную по методике 1, растворяют в

А В С D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

СУ 1 6 4 6 2 5 8 АЗ

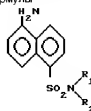
концентрации 7,0 о. е./мл ($\lambda = 300$ нм) в 0,05 трио-НСI буфере (рН 7,4). К 2 мл раствора добавляют 10 мл трипсина (или другого фермента) в концентрации, обеспечивающей гидролиз 1% аргиниламинонафталинсульфамидов за 10 мин, перемешивают, инкубируют 10 мин, при 37°C добавляют 0,6 мл смеси этилацетат-гексан (2:1), перемешивают, верхний слой отделяют, упаривают и разделяют ВЭЖХ на колонке С18-С-18 при 40 °С элюацией 0,05М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (35% - >> 58% линейный градиент за 20 мин) и ацетонитрила с задержкой градиента 6,5 мин. Детекция при 340 нм. Появление всех 15 аминаонафталинсульфамидов в элюате с различными временами выхода показывает, что все они могут быть использованы в качестве детектируемых групп субстратов при определении как одного фермента, так и их смесей. Времена выхода приведены в табл. 4 по порядку их увеличения.

Таким образом, соединения формулы I обладают более высокой относительной интенсивностью флуоресценции (14,6-25,8) по сравнению с аналогом (8,7-13,1). Они все могут быть использованы в качестве

детектируемых групп субстратов при определении ферментов, так как обладают различными временами выхода.

Формула изобретения:

5-Аминаонафталин-1-сульфамиды общей формулы



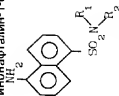
где $R_1 = \text{H}$;
 $R_2 = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_3\text{H}_7, \text{изо-C}_3\text{H}_7, \text{изо-C}_4\text{H}_9,$
 трет-C₄H₉, C₆H₁₁.





$\text{C}_2\text{H}_4\text{OH}, \text{C}_2\text{H}_4\text{OCH}_3, \text{C}_2\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_5$, или $R_1 =$
 $R_2 = \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_3\text{H}_7$, или $\text{NR}_1\text{R}_2 = \text{N}(\text{CH}_2)_6$,
 в качестве детектируемых групп
 субстратов для флуоресцентного анализа
 пептидаз.

Таблица 1

Характеристики 5-аминонафталин-1-сульфамидов



Соединение	R ₁	R ₂	Выход, %	Температура плавления, °С	R _f	Брутто-формула	Данные элементного анализа (найдено/вычислено), %				ПМР-спектр (δ, м.д. ДМСО) R ₁ , R ₂
							C	H	N	S	
1	H	CH ₃	84	204-208	0.28	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ SO ₂	55.86 55.91	5.18 5.12	11.60 11.85	13.42 13.57	2.38 (CH ₃)
2	H	C ₂ H ₅	77	130-133	0.45	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ SO ₂	57.70 57.58	5.63 5.64	11.30 11.19	12.88 12.81	0.83 (CH ₃), 2.72 (CH ₂)
3	H	C ₃ H ₇	93	115-118	0.49	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ SO ₂	59.57 59.07	6.26 6.10	10.73 10.60	12.08 12.13	0.64 (CH ₃), 1.27 (CH ₂), 2.71 (CH ₂)
4	H	изо-C ₃ H ₇	91	178-182	0.47	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ SO ₂	59.12 59.07	6.28 6.10	10.63 10.60	11.94 12.13	0.83 (CH ₃), 3.22 (CH)
5	H	изо-C ₄ H ₉	85	138-139	0.52	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ SO ₂	60.64 60.41	6.41 6.52	10.25 10.06	10.99 11.52	0.67 (CH ₃), 1.48 (CH) 2.46 (CH ₂)
6	H	трет-C ₄ H ₉	92	213-214	0.43	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ SO ₂	60.41 60.41	6.50 6.61	10.29 9.25	11.51 10.02	1.00 (CH ₃)
7	H		93	233-234	0.38	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ SO ₂	63.31 63.13	6.62 6.62	9.25 9.20	10.52 10.53	1.20 (CH ₂) 2.89 (CH)
8	H		80	180-184	0.52	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ SO ₂	65.38 65.36	5.24 5.16	8.78 8.97	10.40 10.76	3.95 (CH ₂) 7.10 (C ₆ H ₅)
9	H	C ₂ H ₄ OH	77	140-144	0.56**	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ SO ₂	54.13 54.12	5.27 5.30	10.60 10.52	11.99 12.04	2.77 (CH ₂) 3.25 (CH ₂) 4.52 (OH)

Продолжение табл. 1

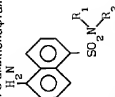
Соединение	R ₁	R ₂	Выход, %	Температура плавления, °C	R _f	Брутто-формула	Данные элементного анализа (найденно/вычислено), %				ПМР-спектр δ , м.д./ДМСО R ₁ , R ₂
							C	H	N	S	
10	H	C ₂ H ₄ OCCH ₃	91	111-115	0.35	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ S ₂	55.91	5.79	10.00	11.23	2.90 (CH ₂) 3.01 (CH ₃)
11	H	C ₂ H ₄ OCCH ₃	93	79-82	0.42	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ S ₂	55.70	5.75	9.99	11.44	3.22 (CH ₂)
12	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	95	104-107	0.69	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ S ₂	57.13	6.17	9.70	10.59	0.94 (CH ₃) 2.97 (CH ₂)
13	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	80	143-144	0.64	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ S ₂	60.24	6.53	10.17	10.89	3.26 (CH ₂)
14	NH ₂ , R ₂ = N(CH ₂) ₆		70	106-110	0.76	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ S ₂	60.41	6.52	10.06	11.52	0.92 (CH ₃) 3.24 (CH ₂)
							62.75	7.19	9.30	10.37	0.67 (CH ₃) 1.38 (CH ₂)
							62.72	7.24	9.14	10.46	3.11 (CH ₂)
							63.22	6.59	9.33	10.33	1.44 (CH ₂) 3.23 (CH ₂)
							63.13	6.62	9.20	10.53	

* Хлороформ-этилацетат (2:1)

** Этилацетат-метанол (9:1).

Таблица 2

Флюоресценция 5-аминонафталин-1-сульфамидов



Пример	R ₁	R ₂	c 10 ⁵ , моль/л	D ₃₅₀	λ _m , нм	J, мм	J/c 10 ⁻⁵
1	NR ₂ -N(CH ₂) ₅		5,050	0,228	560	66	13,1
2			5,156	0,229	568	45	8,7
3		CH ₃	4,496	0,222	555	80	14,6
4		C ₂ H ₅	4,979	0,208	550	95	19,1
5		C ₃ H ₇	4,988	0,210	568	104	20,8
6		изо-C ₃ H ₇	4,906	0,210	568	117	23,9
7		изо-C ₄ H ₉	4,977	0,218	549	97	19,5
8		трет-C ₄ H ₉	5,040	0,214	547	130	25,8
9		C ₅ H ₁₁	4,991	0,209	547	104	20,8
10			4,978	0,219	549	122	24,5
11			4,995	0,227	556	92	18,4
12		C ₂ H ₄ OH	5,114	0,205	548	93	18,2
13		C ₂ H ₄ OC ₂ H ₅	4,795	0,210	555	88	18,4
14		C ₂ H ₄ OC ₂ H ₅	4,867	0,220	549	87	17,9
15		C ₂ H ₅	5,168	0,229	557	90	17,4
16		C ₃ H ₇	5,031	0,198	553	100	19,9
17	NR ₂ -N(CH ₂) ₆		5,105	0,229	555	97	19,0

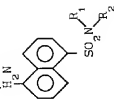
Примечания. D₃₅₀ – оптическая плотность при длине волны 350 нм;

λ_m – максимум полосы флюоресценции.

Спектры сняты в растворах фосфатного буфера (0,067 М, pH 7,2).

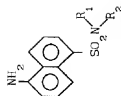
Таблица 3

5-Аминонафталин-1-сульфамиды, использованные в синтезе



R1	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R2	CH3	CH3	C2H5	C3H7	изо-C3H7	изо-C4H9	трет-C4H9	C5H11	C6H13	C6H13	C6H13
Количество, г	0.24	0.25	0.26	0.26	0.26	0.28	0.28	0.29	0.29	0.30	0.30
Н	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
NR1R2 вместе N(CH2)6	0.29	0.29	0.25	0.26	0.26	0.28	0.28	0.29	0.29	0.30	0.30
С3H7ОН	0.27	0.27	0.28	0.28	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.30	0.30
С2Н4ОСН3	0.28	0.28	0.28	0.28	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.30	0.30
С2Н5	0.28	0.28	0.28	0.28	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.30	0.30
С3Н7	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
С3Н7	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31

Таблица 4



Соединение	R1	R2	Время, мин
1	H	C2H4OH	1,7
2	H	CH3	2,3
3	H	C2H4OCH3	2,6
4	H	C2H5	3,3
5	H	C2H4OC2H5	4,0
6	H	изо-C3H7	5,0
7	H	C3H7	5,2
8	H	трет-C4H9	6,6
9	H	изо-C4H9	8,0
10	H		9,1
11	C2H5	C2H5	9,2
12	H		11,0
13	H	$\text{NR}_1\text{PR}_2\text{C}_5\text{H}_{11}$	12,1
14			14,0
15	C3H7	C3H7	15,7